

博士論文

プロテアーゼ加水分解ホエイプロテインを用いた ウシ乳房炎に対する治療剤の開発

2021 年 9 月

徳島大学先端技術科学教育部 物質生命システム工学

生命テクノサイエンスコース 博士後期課程 3 年

田坂徹

目次

| | |
|------------|---------|
| 第 1 章 要旨 |1 |
| 第 2 章 序論 |2 |
| 第 3 章 実験方法 |6 |
| 第 4 章 結果 |14 |
| 第 5 章 考察 |23 |
| 第 6 章 結論 |27 |
| 第 7 章 謝辞 |27 |
| 第 8 章 参考文献 |28 |

第1章 要旨

ホエイプロテイン (WP: Whey Protein) は、チーズ製造の副産物である乳清 (ホエイ) から単離された球状タンパク質で、主に β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、ラクトフェリンの混合物で構成されており豊富な免疫調節タンパク質を含んでいる。種々のプロテアーゼを用いて WP を加水分解することで、低分子化ホエイプロテイン (LMW-WP: Low-Molecular-Weight Whey Protein) を調製しマクロファージの貪食活性化とサイトカイン産生を評価した。種々のプロテアーゼで処理された WP の SDS-PAGE から、ほとんどのバンドが消失または減少した。加えて、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) によって、種々のプロテアーゼで処理した WP の保持時間は、未処理の WP と比較してより長い時間にシフトした。これらの結果から、WP を種々のプロテアーゼで加水分解することで、LMW-WP の調製に成功した。LMW-WP は 1~1000ng の範囲の濃度依存性マクロファージ貪食活性の増強を示した。さらに、LMW-WP は TNF- α 産生量を有意に増加させた。

ウシ乳房炎はウシの乳房内や乳腺組織内に細菌などの病原微生物が侵入し増殖することによって起る乳房の炎症の総称である。LMW-WP のマクロファージ貪食活性化能と炎症性サイトカイン TNF- α 産生能の増強は、感染症であるウシ乳房炎に効果的であると推察し、LMW-WP のウシ乳房炎に対する治療効果を評価した。乳房炎罹患牛に対して LMW-WP を経口、腹腔内、経膈の 3 つの経路で投与した。その結果、1000 mg の腹腔内投与群では 4 分房のうち 3 分房で体細胞数が出荷基準値の 40 万個/mL 未満に低下し、75%の有効性を示した。また、膈内投与群は 9 分房のうち 6 分房で体細胞数が 40 万個/mL 未満に低下し、67%の有効性を示した。さらに、1000 mg の腹腔内投与したウシの乳汁中 IgA 濃度測定

を測定したところ、治療効果がみられた分房で有意に IgA 濃度が低下したことが確認された。一方、LMW-WP は、マウスマクロファージ細胞に対して IL-5,6,9,12、MCP-1、VEGF のサイトカイン産生を増加させることが確認されたが、抗菌作用は示さなかった。LMW-WP 投与後における体細胞数の減少は、LMW-WP がウシ体内のマクロファージに作用して貪食活性および各種サイトカイン産生を増強することで病原微生物の増殖を抑制したと考えられる。本研究結果より、LMW-WP はウシ乳房炎に対して有効な治療剤となり得る可能性が示された。

第2章 序論

マクロファージは、血液中の単核白血球から分化する自然免疫応答を担う細胞で、主要な働きとして細菌、ウイルス、癌細胞のような異物や死細胞を自らが取り込み処理をする貪食作用がある。マクロファージは、貪食作用によって取り込んだ異物を細胞内のリソソームによって分解し、細胞内の MHC クラス II 分子(MHC-II)と結合させ、細胞表面に表出させることで抗原提示を行う[1-3]。マクロファージはサイトカインにより活性化するが、サイトカインの種類によって異なる働きを持つマクロファージへと分化する。炎症性単球が TNF- α や IFN- γ などを受けて分化し、病原体や寄生虫感染防御に働く M1 型（炎症性マクロファージ）と組織常在性単球が IL-4 や IL-13 など Th2 型サイトカインを受けて分化し、組織修復に働く M2 型（抗炎症マクロファージ）がある。

当研究室では以前にヒト血清から作られたマクロファージ活性化剤「血清 GcMAF」およびウシの初乳から作られた「初乳 MAF」の開発に成功した[4-5]。GcMAF (group-specific component (Gc) protein-derived macrophage activating

factor) は、血清中の Gc タンパク質 (ビタミン D 結合タンパク質) を脱グリコシル化した N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分を有する糖タンパク質である[6-7]。 GcMAF は、マクロファージの貪食活性、抗血管新生活性、抗腫瘍活性を増強することが報告されている[8-10]。 GcMAF は臨床研究が行われており、癌と多発性硬化症の治療経験がある[11-13]。初乳 MAF は、分娩後数日間に分泌される乳汁で、効能として運動力増強や免疫力亢進を持ち、免疫グロブリンや糖タンパク質を豊富に含有し、ヒト血清と成分が類似している初乳を GcMAF と同様の脱グリコシル化することで調製される[14]。

| | Units | ウシ初乳 | | | ヒト血清 | | |
|-----------------|-------|------|-----|-----|------|------|------|
| | | ① | ② | ③ | ① | ② | ③ |
| 総タンパク質 | g/dl | 6.5 | 4.5 | 4.1 | 6.2 | 5.8 | 6.2 |
| アルブミン | g/dl | 2.0 | 1.4 | 0.6 | 3.8 | 3.7 | 4.0 |
| α 1グロブリン | % | | | | 3.0 | 3.6 | 3.4 |
| α 2グロブリン | % | | | | 9.3 | 9.1 | 7.4 |
| β グロブリン | % | | | | 8.9 | 8.5 | 10.2 |
| γ グロブリン | % | | | | 16.7 | 12.5 | 12.8 |
| IgG | mg/dl | 871 | 456 | 924 | 1139 | 907 | 1019 |
| IgA | mg/dl | 42 | 36 | 132 | 281 | 171 | 97 |
| IgM | mg/dl | 27 | 21 | 259 | 115 | 136 | 62 |

表-1 ウシ初乳とヒト血清の成分組成

このウシの初乳から産生されたウシ初乳 MAF はマクロファージ活性を有し、上気道炎やアトピー性皮膚炎などに効果があることが報告されている。しかしながら、血清 GcMAF は、予後の免疫機能調節のために安価で長期服用することが困難であり、不特定多数のヒト血清が由来となるため 感染因子混入のリスクがあるといった課題がある。初乳 MAF は食品分野における製造工程の煩雑さや、原料としているウシ初乳が、乳及び乳製品の規格等に関する省令で、分娩後 5 日以内の牛から搾取してはならないとしている為、免疫グロブリン

ンや糖タンパク質を豊富に含有している分娩後6日以降の初乳の安定的な入手が難しいといった課題がある。これらの課題を解決するため、代替原材料としてWPに焦点を当てた。WPはチーズ製造の際に固形物と分離された副産物であるホエイから単離されるタンパク質の混合物であり、主な組成は β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、ラクトフェリン、ウシ血清アルブミン、免疫グロブリンで、豊富な免疫賦活タンパク質を含んでおり、比較的安価で大量に入手可能である[15-16]。加えて、WPの加水分解生成物は免疫疾患を改善する効果を有することが報告されている[17-18]。前述のGcMAFと初乳MAFの問題を解決するために、タンパク質をポリペプチドおよびアミノ酸への分解を触媒するプロテアーゼを用いてWPを加水分解し、LMW-WPを調製した。

ウシ乳房炎はウシの乳房内や乳腺組織内に細菌などの病原性微生物が侵入することで起こる炎症の総称である。乳房の腫脹、疼痛、熱感、発赤を伴い乳質の変性や乳量の低下といった異常や、乳汁中の体細胞数の増加、pHが異常を示す。その結果、乳房炎に罹患したウシは、生産乳量の減少、乳質の低下、治療費支出、出荷制限期間における生乳廃棄、淘汰更新、体細胞数増加による乳価へのペナルティ、作業上の損失などを原因とした酪農経営へ及ぼす影響は大きく、経済的損失は日本国内で約800億円に上る[19-20]。乳房炎を引き起こす病原微生物は140種以上知られており、その多様性が治療を困難にしている[21]。現在、乳房炎の治療法として最も用いられるのが抗生剤である。しかし抗生剤使用の問題として出荷制限による廃乳や薬剤選択の煩雑さ、さらに慢性的な抗生剤の使用による薬剤耐性菌の出現が危惧されている。また、オゾン療法やステビアの経口投与、rbGM-CSF乳房内注入といった抗生剤に替わる治療法が様々検討されているが、いまだに有効な治療法は確立されていない[23-

25]。

LMW-WP はマクロファージ貪食活性および抗腫瘍効果を有し炎症性サイトカインカスケードの形成および組織の機能障害と破壊にさまざまな生理学的および病原性の影響を及ぼす TNF- α 産生の誘導を有する。このため LMW-WP のマクロファージ貪食活性化能と TNF- α 産生能が、種々の細菌感染によって発症するウシ乳房炎に対して有効であると推察した。本研究では、乳房炎罹患牛に LMW-WP を投与して、乳汁中の体細胞数と免疫グロブリン A (IgA : Immunoglobulin A) 濃度の変化および網羅的サイトカイン産生を評価した。IgA は他の免疫グロブリンと比較して抗原特異性が低く様々な病原体に結合できるため、全身の粘膜面において細菌やウイルスなどの病原体の体内への侵入を防ぐ役割を担っている。腸管粘膜には免疫機能に関わる細胞の約 70%が存在する。腸で分化誘導された IgA 産生細胞は全身の粘膜において IgA 分泌を行い感染症予防に寄与している[26-28]。さらに WP は抗菌作用を有することや、様々な感染症や癌に対する宿主防御機構に関与しているラクトフェリンが含まれていることから、抗菌性を評価することで LMW-WP の作用機序の解明を試みた。[29-31]

第3章 実験方法

プロテアーゼによる WP の加水分解

WP パウダー (PRODIET 80S、Ingredia、フランス) 3 g を 100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (SPB、pH 7.0) 100mL に溶解し、約 20 分間攪拌して、3% WP 溶液を調製した。WP 溶液を 4°C・1 時間遠心分離 (9,000×g) した後に上清を回収した。回収した上清を Snake Skin Dialysis Tubing 3.5K (サーモフィシャーサイエンティフィック、東京、日本) で一晩透析処理した。透析した溶液を 0.2μm フィルター (アドバンテック、東京、日本) で濾過滅菌をおこなった。

4 つのプロテアーゼ (プロテアーゼ P 「アマノ」 3SD、プロテアーゼ A 「アマノ」 SD、プロテアックス、プロチン SD-NY 10、天野エンザイム、名古屋、日本) で WP の加水分解をおこなった。各プロテアーゼ 1.35mg をホエイプロテイン 27mg に加え、37°C で 1 時間酵素処理した。その後、プロテアーゼ P 「アマノ」 3SD は 60°C で 10 分間、プロテアーゼ A 「アマノ」 SD、プロテアックス、プロチン SD-NY 10 は 80°C で 5 分間加熱し失活処理した。

SDS-PAGE および Western Blotting

サンプル中のタンパク質量は牛血清アルブミン (BSA、富士フィルム和光純薬、大阪、日本) を標準品として、BCA 法により定量し、各サンプル中のタンパク質濃度が等しくなるように超純水により希釈した。各サンプルのタンパク質量として 10μg をアクリルアミド濃度 7.5-15% および 15-20% のグラジェントゲル (XV PANTERA GEL MP、ディー・アール・シー、東京、日本) を用いて、300 V 定電圧・15 分間で加水分解された WP をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけた。泳動終了後、PVDF

膜に転写を 28V 定電圧・10 分で行った。転写後、0.1%の Tween 20 および 1% BSA を含むトリス緩衝生理食塩水 (pH7.4) で 4°C・一晩インキュベーションすることでブロッキングした。PVDF 膜に一次抗体として GalNAc 部分に特異的な Wisteria floribunda Lectin,Biotin Conjugate (WFA) (Vector Laboratories Inc、カリフォルニア、アメリカ) を用いて室温で一時間振とうした。洗浄後、二次抗体として streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (GE Healthcare Life Sciences、ウプサラ、スウェーデン) を用いて室温で一時間振とうした。抗体が結合した各種タパク質は ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences)、LumiCube (リポニクス、東京、日本) を用いて撮影し可視化・定量を行った。

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 分析

GPC 分析は、SPD-M20A 検出器と CTO-20AC カラムオーブンを備えた島津-LC20AD システム (島津製作所、京都、日本) を使用して実施した。クロマトグラフィーによる分離は、TSKgel G3000SWXL カラム (300×7.8 mm id;5μm) (東ソー、東京、日本) を使用した。GPC アッセイは、流速 1 ml/min、カラム温度 25°C、移動相として 150mM 塩化ナトリウムを含む 50mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) のイソクラティック溶離で実施した。分析条件は、紫外線 (UV) 検出 260nm、注入量 100μl、総分析時間は 20 分とした。データ解析は LabSolution LC/GPC (島津製作所、京都、日本) でおこなった。

in vitro 貪食評価

ICR マウス（8 週齢、雄）（日本エスエルシー、浜松、日本）からマクロファージを含むマウス腹腔付着細胞を収集した。そして無血清 RPMI 1640（ライフ テクノロジーズジャパン、東京、日本）に 5×10^5 cells/well で播種し、24well プレート中で 1 時間インキュベートした。培養細胞を無血清 RPMI 1640 で 3 回洗浄して T 細胞および B 細胞などの非接着性細胞から接着性マクロファージを分離し、マウス腹腔マクロファージを得た。マウス腹腔マクロファージを 24well プレートのカバーガラスに重層し、15 時間インキュベートした。その後、LMW-WP を添加し 3 時間インキュベートした後に培養物の貪食能を評価した。ヒツジ赤血球（SRBC）（日本バイオサプライセンター、東京、日本）は、ウサギ溶血性血清（抗ヒツジ赤血球）（コスモバイオ、東京、日本）によってオプソニン化した。無血清 RPMI1640 中のオプソニン化 SRBC（0.5%）を、マクロファージでコーティングされた各カバースリップに重ね、1.5 時間インキュベートした。内在化されていない赤血球は、カバースガラスを低張液（リン酸緩衝を生理食塩水で 5 倍に希釈）に浸すことによって溶解した。マクロファージを MeOH で固定し、風乾し、ギムザ染色で染色した。細胞あたりの貪食された赤血球の数を顕微鏡でカウントした。合計で 250 個のマクロファージを各データポイントでカウントした。データは、食作用指数（PI）として表した。これは、貪食された赤血球を含むマクロファージのパーセンテージに、マクロファージごとに貪食された赤血球の平均数を掛けたものとして定義した。

ELISA によるサイトカイン産生の評価

マウスマクロファージ細胞 RAW 264.7 細胞（理研 BRC、茨城、日本）をダル

ベッコ改変イーグル培地（DMEM、富士フィルム和光純薬、大阪、日本）中に 5×10^5 cells/well で 24well プレートに播種し、18 時間インキュベートした後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（PBS、ナカライテクス、京都、日本）で洗浄した。対照として 1 mL の DMEM を加えた。1 μ g のリポ多糖（LPS、Sigma-Aldrich Co.、ミズーリ、アメリカ）および 10 ng のマウス IFN- γ 組換えタンパク質（サーモフィシャーサイエンティフィック、東京、日本）を陽性対照として添加した。未処理の WP または種々のプロテアーゼで処理した LMW-WP100～1000 ng を添加し、37°C で 24 時間インキュベートし、培養上清を TNF alpha Mouse Uncoated ELISA Kit（eBioscience、カリフォルニア、アメリカ）を用いて分析した。さらに種々のプロテアーゼで処理した LMW-WP が TNF- α 産生抑制に及ぼす影響を調べるために、LPS（1 μ g）と IFN- γ （10 ng）を、WP および LMW-WP と同時に添加した。20mM クルクミン（東京化成工業、東京、日本）を陽性対照として用いた。マイクロプレートリーダーInfinnity M200（Tecan、チューリッヒ、スイス）で 450nm（reference wavelength 620 nm）の吸光度を測定した。

M1 型マクロファージ分化誘導

ICR マウス（8 週齢、雄）（日本エスエルシー、浜松、日本）からマクロファージを含むマウス腹腔付着細胞を収集した。そして無血清 RPMI 1640 中に 5×10^5 cells/well で播種し、24well プレート中で 18 時間インキュベートした。1 μ g の LPS および 10 ng のマウス IFN- γ 組換えタンパク質を陽性対照として添加した。未処理の WP または種々の LMW-WP100～1000 ng を各ウェルに添加し、37°C で 24 時間インキュベートした。その後、1 %BSA で一晩インキュベート

し、FITC-CD86 抗体 (Bioss、マサチューセッツ、アメリカ) を添加して 1 時間免疫染色を行った。その後、蛍光検出をおこなった。

LMW-WP を用いたウシ乳房炎の臨床試験

LMW-WP 投与の 24 時間前に、被験動物であるウシ全乳房 (4 カ所) 乳汁中の体細胞数を測定した。乳房炎罹患の判定基準として国際乳製品連盟の基準を使用した。国際乳製品連盟は、乳房炎を体細胞数が 400,000 個/ml 以上であると定義しており、この基準は日本でも使用されている[32]。LMW-WP 投与経路は、経口、腹腔内、または膣内の 3 経路で実施した。経口投与群では、3 頭 (乳房 7 カ所) を投与群とし、1 頭 (乳房 1 カ所) を対照とした。LMW-WP (100 g) を水道水 100mL に溶解し単回投与した。体細胞数は投与直前、投与 6 時間後、12 時間後、24 時間後、5 日後に測定した。検体の採取方法は、乳首の汚れを布等で取り除き、イソプロパノールで乳首を消毒した後、最初に搾り出される乳汁は乳頭孔付近に溜まっているので、その後に搾り出す乳汁と比べて細菌数が多いため、5 回手で絞り排除した後に採取した。体細胞の測定は徳島酪農協会がおこなった。ウシ乳房炎治癒の判断基準として 5 日後、体細胞数が 400,000 個 / ml 未満の乳房を有効とした。腹腔内投与群では、3 頭 (乳房 5 カ所) を 300mg、2 頭 (乳房 4 カ所) を 1000mg、1 頭 (乳房 3 カ所) を対照として投与した。生理食塩水に溶解した LMW-WP (300mg または 1000mg) を 5 日間腹腔内注射し、1 日目から 6 日目まで体細胞数を測定した。ウシ乳房炎治癒の判断基準として 6 日目に体細胞数が 400,000 個 / ml 未満になった乳房を有効であるとした。膣内投与群では、4 頭 (乳房 9 カ所) を投与群とし、1 頭 (乳房 3 カ所) を対照とした。投与方法は、カプセル充填した LMW-WP

(1000 mg) を 5 日間連続して膣に注入した。ウシ乳房炎治癒の判断基準は腹腔内投与群と同じである。臨床試験用の牛は徳島県内の 3 つの農場から提供された。



図-1 LMW-WP の乳房炎罹患牛への腹腔内投与

乳汁中 IgA 濃度測定

乳汁を 8000rpm で 15 分間遠心分離し、上清を 0.2 μ m フィルター（アドバンテック、東京、日本）で処理した。その後、滅菌水で 500 倍希釈することで IgA 測定の検体とした。検体を Bovine IgA ELISA Kit（Bethyl Laboratories、テキサス、アメリカ）を用いて分析した。マイクロプレートリーダーInfinnity M200（Tecan、チューリッヒ、スイス）で 450nm の吸光度を測定した。

マイクロアレイを用いた網羅的サイトカイン産生能の評価

マウスマクロファージ細胞 RAW 264.7 細胞を ϕ 10cm シャーレに 1×10^6 cells 播種し DMEM を加え 48 時間インキュベートした。その後、培地を除去し PBS

で2回洗浄し、無血清 DMEM を加えた。10 mg の WP または 10 mg の LMW-WP を添加し、37℃で 48 時間インキュベートした後、上清を回収した。マイクロアレイは、Quantibody®MouseCytokine Array (RayBiotech Life Inc.、ジョージア、アメリカ) を使用した。アレイスキャナーGenePix®4400A (Molecular Devices LLC、カリフォルニア、アメリカ) を使用してアレイをスキャンした。分析ソフトウェア Array-ProAnalyzer®Ver.4.5 (Media Cybernetics、Inc.、メリーランド、アメリカ) を使用して、得られた画像 (TIFF 画像、16 ビット形式) から各スポットの蛍光強度値を算出した。マイクロアレイの測定と分析はフィルジェン (名古屋、日本) で実施された。

微小液希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

200mg の WP および LMW-WP を 1ml の蒸留水に溶解し、0.2µm シリンジフィルターで滅菌した。WP 溶液と LMW-WP 溶液をニュートリエントブロス培地 (NB 培地) で希釈し、98~50,000µg / ml の濃度に調製した。希釈した溶液を 96well マイクロプレートに 80µl ずつ加えた。37℃・16 時間インキュベートしたコアグラゼ陽性ブドウ球菌株 (黄色ブドウ球菌亜種アウレウス NBRC 12732) を 1×10^6 個/well の濃度で各ウェルに添加した。ブランクとして機能させるために、160µl の NB 培地のみを 1 つのウェルに加えた。対照として、80µl の NB 培地とコアグラゼ陽性ブドウ球菌の混合物 (1×10^6 cells/well) を準備した。マイクロプレートを 37℃で 24 時間インキュベートした。判定基準として、インキュベーション期間後に細菌の増殖が観察されなかった濃度を MIC 値として定義した。

統計分析

データは、少なくとも 3 回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差として表す。結果間の差の統計的有意性は、スチューデントの t 検定を用いて分析した。 $P < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

第4章 結果

SDS-PAGE および Western Blotting

各種プロテアーゼを使用して WP の加水分解を試みた。SDS-PAGE およびクーマシーブリリアントブルー（CBB）染色の結果は、未処理の WP で発現した多くのバンド（61.2、56.5、27.9-32.9、25.9、17.9-20.0、および 12.8 kDa）が加水分解したホエイプロテインで消失したことを示した。WFA レクチンを使用した Western Blotting で測定したところ、GalNAc 陽性バンド（56kDa 付近）はプロテアーゼ処理した WP で大幅に減少した。（図-2C）

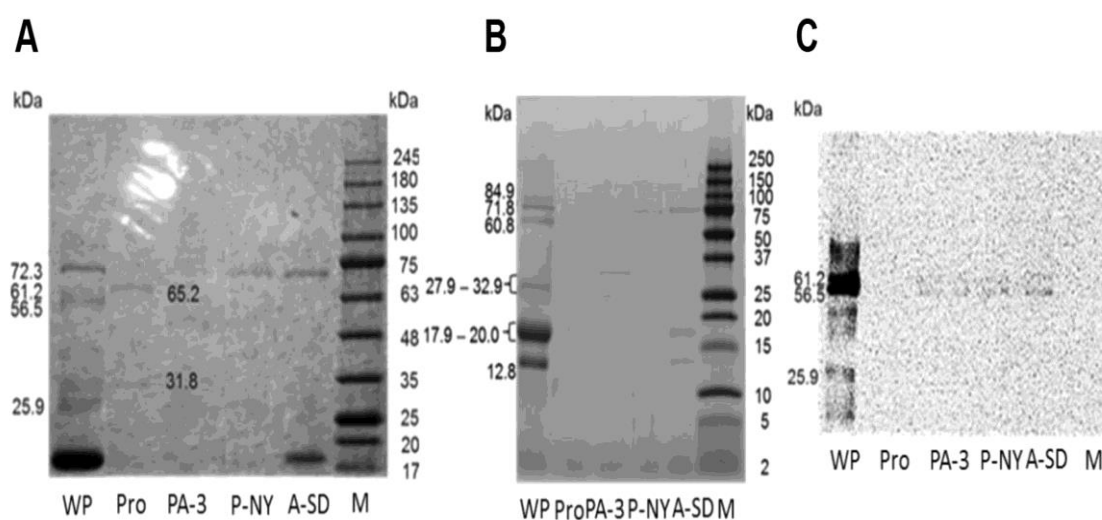


図-2 SDS-PAGE、CBB 染色、およびプロテアーゼ処理ホエイプロテインの Western Blotting

(A) CBB 染色ゲル (17-245kDa)、(B) CBB 染色ゲル (2-250kDa)、(C) WFA レクチンでプローブした Western Blot

M：マーカー; WP：ホエイプロテイン、Pro：プロテアックス、PA-3：プロテアーゼ P「アマノ」3SD、P-NY：プロチン SD-NY 10 10;、A-SD：プロテアーゼ A「アマノ」SD

GPC 分析

GPC 分析により、各種プロテアーゼの加水分解により、未処理の WP が示す 9～10 分のメインピークが消失し、12 分と 14 分付近に新しいピークが観察された。(図 3A～E) GPC 分析で確認されたピークの後退と SDS-PAGE の結果から、各種プロテアーゼが WP 中のタンパク質を加水分解したことを示した。これらの結果は、WP 中のタンパク質がアミノ酸およびペプチドに分解され、低分子化 WP (LMW-WP) が調製されたことを示している。

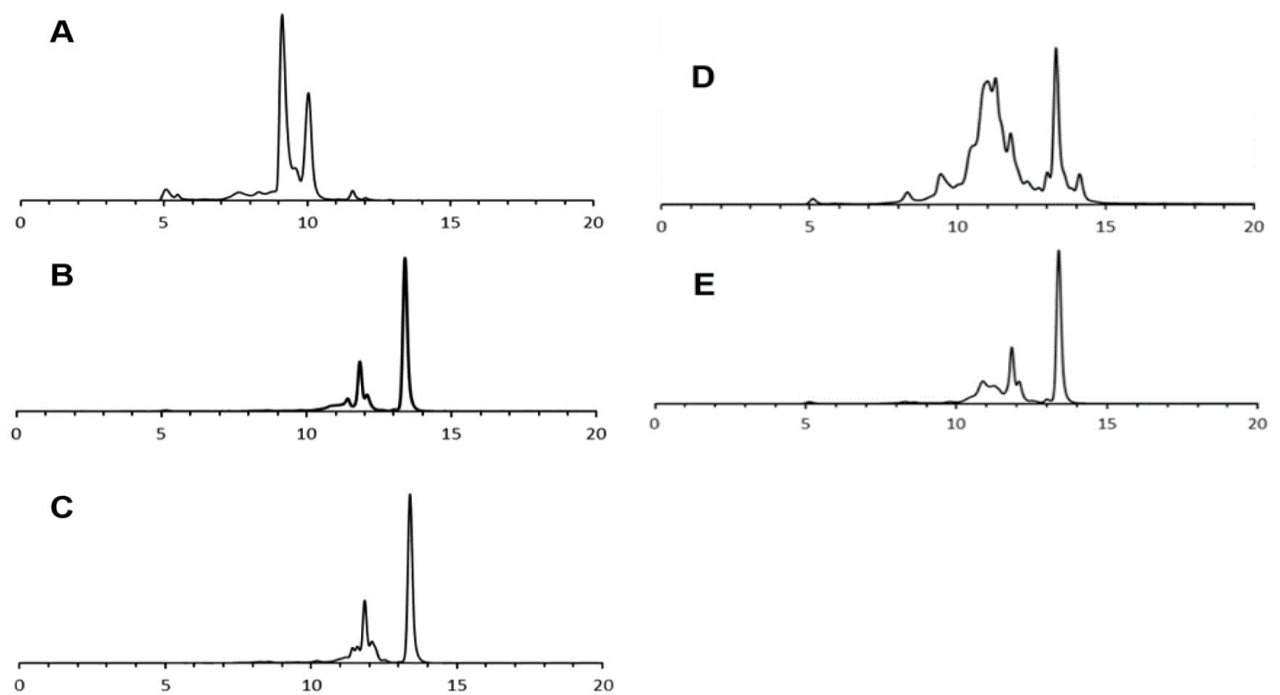


図-3 プロテアーゼ処理ホエイプロテインの GPC クロマトグラム

- (A) ホエイプロテイン、(B) プロテアックス、(C) プロテアーゼ P「アマノ」
3SD、
(D) プロチン SD-NY 10、および (E) プロテアーゼ A「アマノ」SD

LMW-WP のマクロファージ貪食活性化能

LMW-WP 免疫調節効果を評価するために、マウス腹腔マクロファージの貪食作用の活性化を評価した。すべての LMW-WP は、濃度依存的にマクロファージの貪食作用の活性化を示した (図 4A-D)。さらに、1~1000 ng の濃度の LMW-WP は、未処理の WP と比較して、貪食作用の有意な増強を示した。

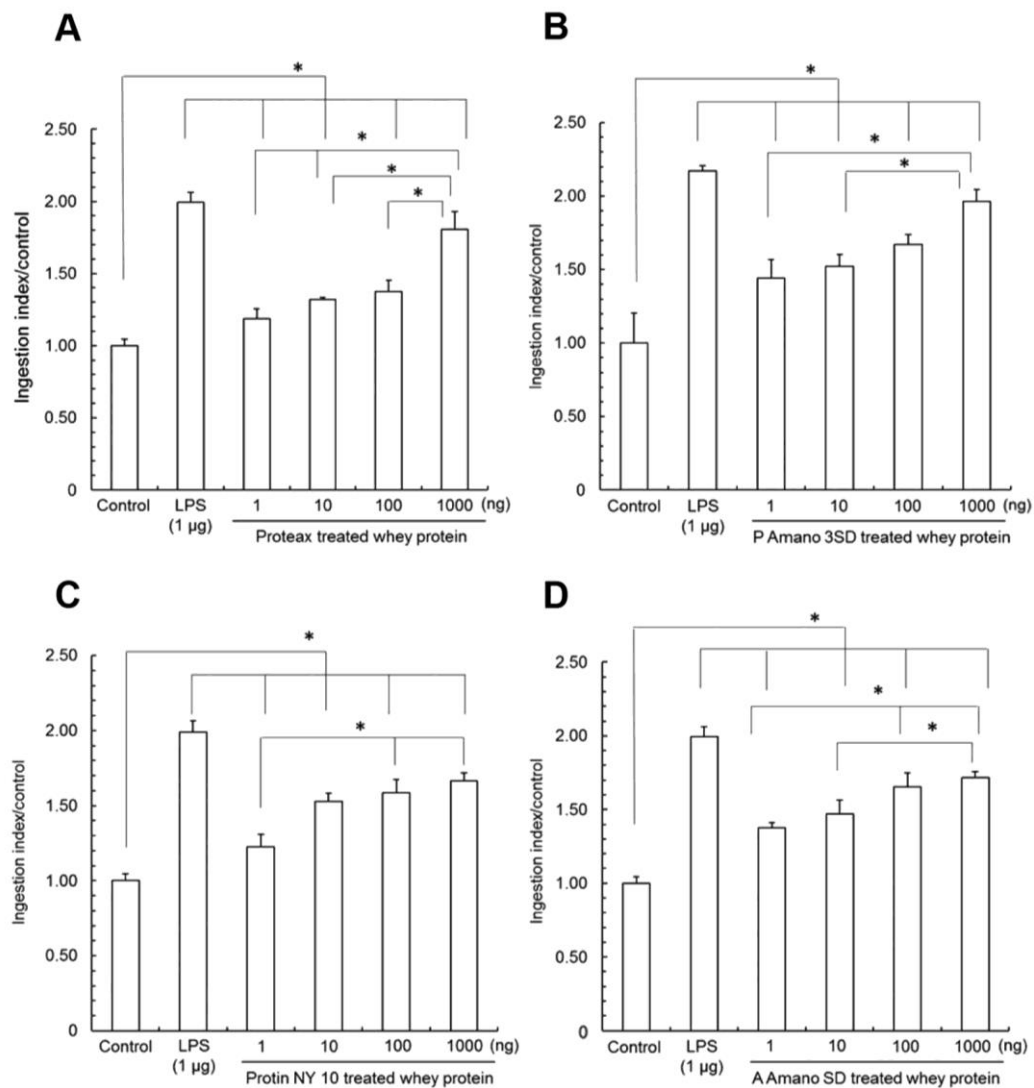


図-4 加水分解ホエイプロテインのマクロファージ食作用活性

(A) プロテアックス、(B) プロテアーゼ P「アマノ」3SD、(C) プロチン SD-

NY 10、(D) プロテアーゼ A「アマノ」SDA 各実験は 3 回行い、データは平均±SD (* p<0.05) を示す。

マクロファージに対する LMW-WP のサイトカイン産生

マウスマクロファージ細胞 RAW264.7 細胞を用いて、LMW-WP の炎症性サイトカイン TNF- α 産生および抑制能を評価した。TNF- α の産生は、1000 ng の LMW-WP 添加で有意に増加した (図 5A)。対照的に、LPS および炎症誘発性因子である IFN- γ で処理し、炎症を誘導した RAW 264.7 細胞では、LMW-WP は TNF- α 産生に対する抑制効果を示さなかった (図 5B)。

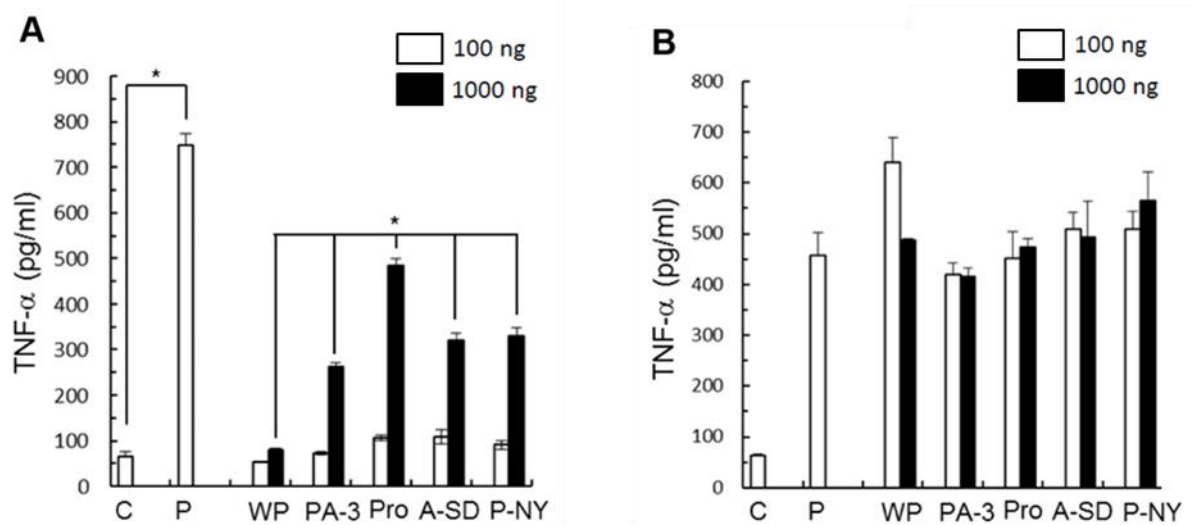


図-5 マクロファージに対する加水分解ホエイプロテインの TNF- α 産生/抑制能

(A) TNF- α 産生評価、(B) TNF- α 産生抑制評価

WP：ホエイプロテイン、PA-3：プロテアーゼ P「アマノ」3SD P、Pro：プロテアックス、A-SD：プロテアーゼ A「アマノ」SDA、P-NY：プロチン SD-NY 10

各実験は3回行い、データは平均 \pm SD (* $p < 0.05$)を示す。

LMW-WP の M1 型マクロファージ分化誘導

M1 型マクロファージのマーカーである CD86 抗体の発現をマイクロプレートリーダーでの蛍光測定と、蛍光顕微鏡で評価した。LMW-WP でマウス腹腔マクロファージを刺激すると、未処理 WP と比較して CD86 抗体発現が有意に増加することが確認された。(図-6A,B)

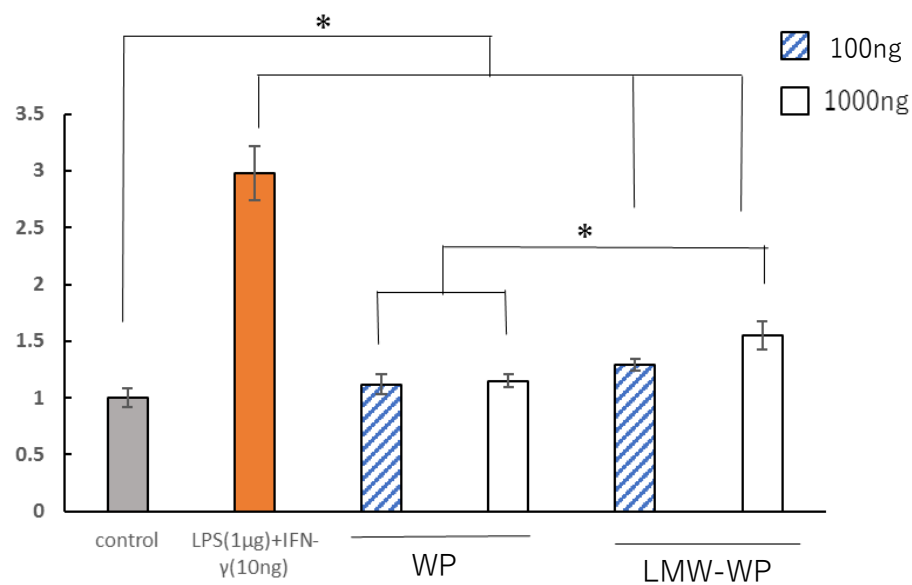


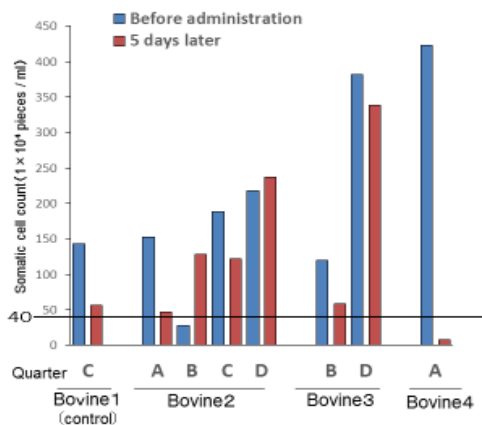
図-6 M1 型マクロファージ分化誘導能

LPS + IFN- γ : 陽性対照

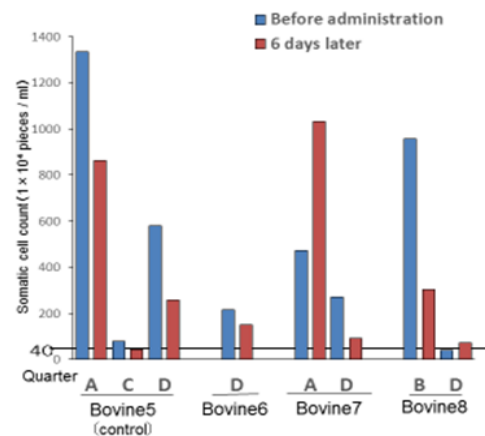
乳房炎罹患牛への LMW-WP 投与

経口投与群では投与後 5 日目で有効性が確認された分房は 7 分房中 1 箇所であった。(図-7A) 300mg の腹腔内投与群は、全ての分房で有効性は確認されなかったが、1000mg の腹腔内投与群では 4 分房中 3 分房 (75%) で有効性が確認された。(図-7B,C) 膣内投与群は 9 分房中 6 分房 (67%) で有効性が確認された。(図-7D) また、1000mg の腹腔内投与群と膣内投与群の全ての分房で LMW-WP 投与後 6 日目に投与前と比較し体細胞数が減少する傾向がみられた。これらの結果から、1000mg の LMW-WP の腹腔内または膣内投与は乳房炎に対して有効性が確認された。

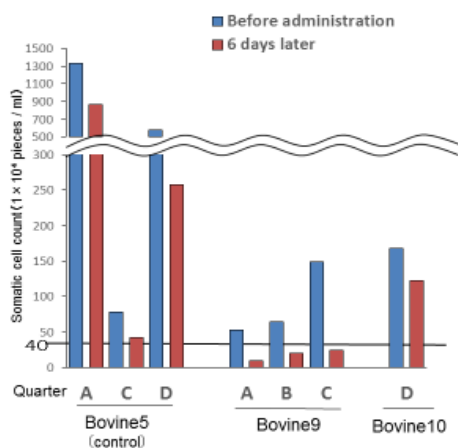
A



B



C



D

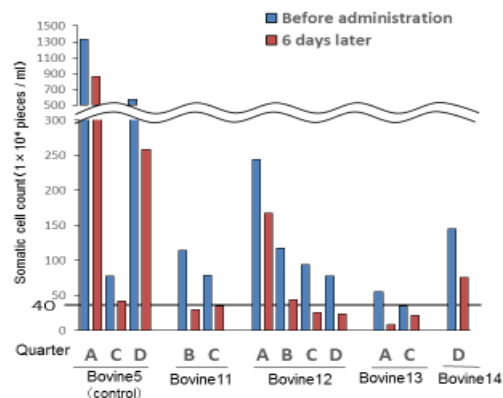


図-7 LMW-WP 投与前後での各乳房の乳汁中の体細胞数

(A) 経口投与群および (B) 300mg-腹腔内投与群および (C) 1000mg-腹腔内投与群および (D) 膣投与群。乳房 A から D は、乳房の位置を表す。(A：左前、B：左後、C：右前、D：右後)

| | | Somatic cell count(1×10^4 peaces/ml) | | | |
|-------------------------|-----|--|------------|------------|-------------|
| Quarter | BA | 6hr later | 12hr later | 24hr later | 5days later |
| Bovine1(Control) | | | | | |
| C | 143 | 102 | 49 | 19 | 56 |
| Bivine2 | | | | | |
| A | 153 | 196 | 212 | 25 | 47 |
| B | 28 | 237 | 52 | 13 | 128 |
| C | 189 | 422 | 116 | 84 | 122 |
| D | 218 | 338 | 240 | 164 | 237 |
| Bovine3 | | | | | |
| B | 120 | 257 | 62 | 200 | 59 |
| D | 382 | 376 | 378 | 224 | 339 |
| Bovine4 | | | | | |
| A | 423 | 519 | 88 | 181 | 8 |

表-2 経口投与群の体細胞数変化

| | | Somatic cell count(1×10^4 peaces/ml) | | | | |
|-------------------------|------|--|---------|---------|---------|---------|
| Quarter | BA | 2nd day | 3rd day | 4th day | 5th day | 6th day |
| Bovine5(Control) | | | | | | |
| A | 1333 | 901 | 1168 | 1332 | 1013 | 863 |
| B | 27 | 13 | 13 | 15 | 10 | 14 |
| C | 78 | 92 | 59 | 37 | 29 | 42 |
| D | 579 | 626 | 223 | 182 | 286 | 258 |

表-3 腹腔内および膣内投与群の対照の体細胞数変化

| Somatic cell count(1×10^4 peaces/ml) | | | | | | |
|--|-----|---------|---------|---------|---------|---------|
| Quarter | BA | 2nd day | 3rd day | 4th day | 5th day | 6th day |
| Bovine6 | | | | | | |
| D | 216 | 327 | 516 | 530 | 553 | 151 |
| Bovine7 | | | | | | |
| A | — | 473 | 2113 | 700 | 1451 | 1031 |
| D | — | 270 | 194 | 143 | 137 | 92 |
| Bovine8 | | | | | | |
| B | 957 | 1435 | 1564 | 1981 | 1485 | 305 |
| D | 39 | 39 | 56 | 50 | 82 | 72 |

表-4 腹腔内 300mg 投与群の体細胞数変化

| Somatic cell count(1×10^4 peaces/ml) | | | | | | |
|--|-----|---------|---------|---------|---------|---------|
| Quarter | BA | 2nd day | 3rd day | 4th day | 5th day | 6th day |
| Bovine9 | | | | | | |
| A | 53 | 15 | 9 | 7 | 8 | 10 |
| B | 65 | 95 | 72 | 37 | 19 | 20 |
| C | 149 | 72 | 24 | 19 | 19 | 24 |
| Bovine10 | | | | | | |
| D | 168 | 997 | 334 | 407 | 185 | 123 |

表-5 腹腔内 1000mg 投与群の体細胞数変化

| Somatic cell count(1×10^4 peaces/ml) | | | | | | |
|--|-----|---------|---------|---------|---------|---------|
| Quarter | BA | 2nd day | 3rd day | 4th day | 5th day | 6th day |
| Bovine11 | | | | | | |
| B | 114 | 23 | 42 | 21 | 38 | 30 |
| C | — | 79 | 77 | 69 | 67 | 35 |
| Bovine12 | | | | | | |
| A | 244 | 153 | 126 | 176 | 130 | 167 |
| B | 117 | 72 | 90 | 64 | 58 | 44 |
| C | 94 | 66 | 104 | 46 | 64 | 26 |
| D | 78 | 63 | 65 | 46 | 51 | 24 |
| Bovine13 | | | | | | |
| A | 55 | 8 | 10 | 9 | 11 | 8 |
| C | 43 | 39 | 67 | 41 | 28 | 21 |
| Bovine14 | | | | | | |
| D | 145 | 114 | 97 | 101 | 144 | 76 |

表-6 膈内投与群の体細胞数変化

乳汁中 IgA 濃度測定

LMW-WP1000mg の腹腔内投与をおこなったウシ（Bovine12）の各乳房から採取した乳汁中 IgA 濃度を測定した。LMW-WP 投与後、全ての乳房で乳汁中 IgA 濃度及び体細胞数の減少が確認されたが、IgA 濃度の有意な低下が確認されたのは、体細胞数が 400,000 個/ml 未満に減少し、治療の有効性が認められた C および D の乳房であった。

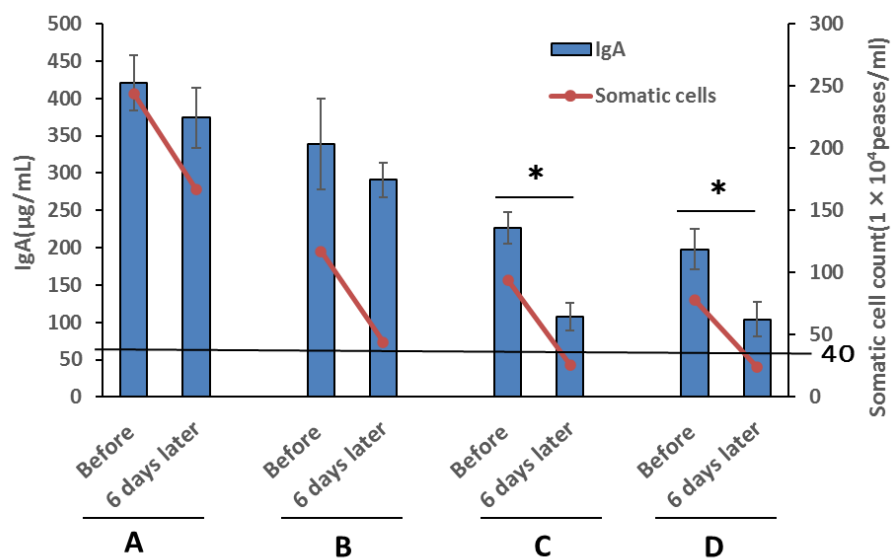


図-8 LMW-WP 投与前後での乳汁中 IgA 濃度と体細胞数の変化

乳房 A から D は、乳房の位置を表す。(A：左前、B：左後、C：右前、D：右後)

| Quarter | Somatic cell stration(1×10 ⁴ peaces/mL) | |
|---------|--|--------------|
| | Before adminiatration | 6 days later |
| A | 244 | 167 |
| B | 117 | 44 |
| C | 94 | 26 |
| D | 78 | 24 |

表-7 LMW-WP 投与前後での体細胞数の変化

乳房 A から D は、乳房の位置を表す。(A：左前、B：左後、C：右前、D：右後)

サイトカイン産生能の網羅的解析

LMW-WP について、網羅的サイトカイン発現を評価するためマイクロアレイを用いたサイトカイン測定を行った。結果として LMW-WP は WP と比較して IL-5 は 1.53 倍、IL-6 は 1.77 倍、IL-9 は 1.49 倍、IL-12 は 1.45 倍、MCP-1 は 15.03 倍、VEGF は 2.06 倍の産生能の増加が確認された。(図-6)

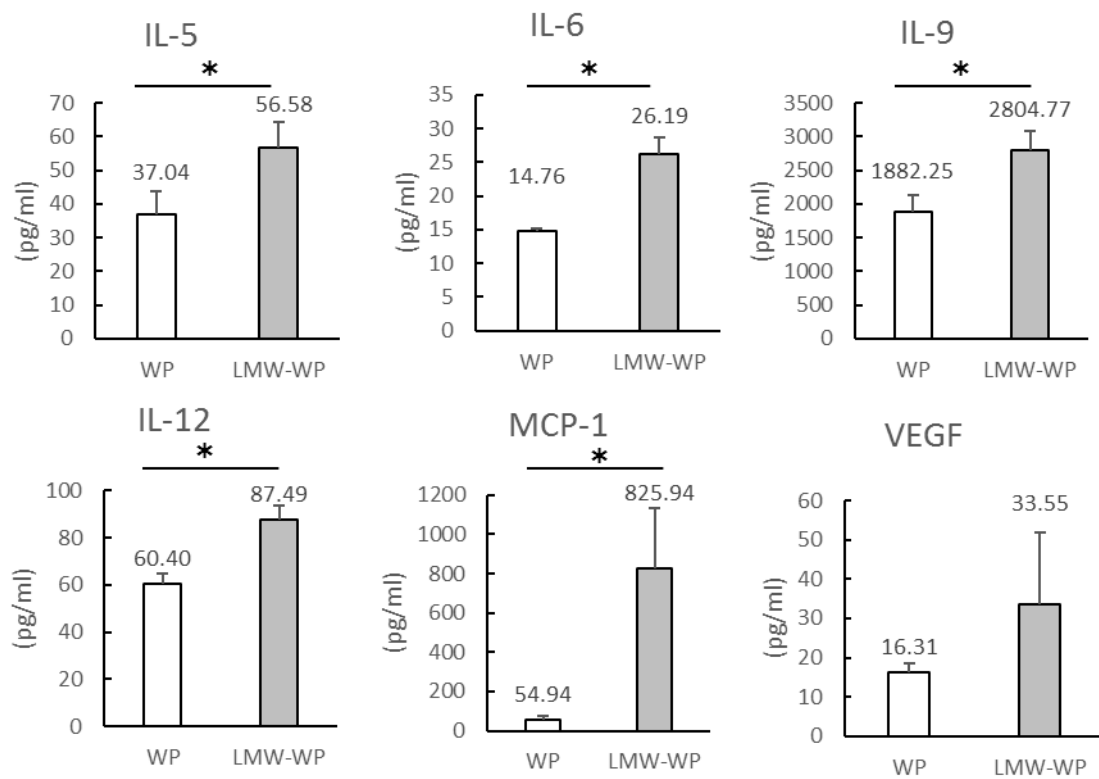


図-9 WP と LMW-WP で刺激されたマクロファージによるサイトカイン産生
データは平均±SD として表されています (*p < 0.05)

最小発育阻止濃度（MIC：Minimal Inhibitory Concentration）測定

ウシ乳房炎に対する LMW-WP の作用機序の一つとして、LMW-WP に含まれる抗菌ペプチドの作用で原因菌の殺菌効果が得られたのではないかと考え、抗菌試験を実施した。結果として、最大濃度である 50,000ppm まで菌の抑制効果は確認されなかった。（表-2）このことから LMW-WP に抗菌ペプチドは含まれていないことが示された。

| | | Sample concentration (μg/ml) | | | | | | | | | | |
|---------|------|------------------------------|--------|--------|------|------|------|-----|-----|-----|----|---|
| | | 50,000 | 25,000 | 12,500 | 6250 | 3125 | 1563 | 781 | 391 | 195 | 98 | 0 |
| WP | S.A. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| LMW-WP | S.A. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Control | S.A. | | | | | | | | | | | + |
| Blank | | | | | | | | | | | | - |

表-8 MIC 測定結果

S.A. : Staphylococcus aureus、Control : NB 培地と菌液の混合液、blank : NB 培地のみ

＋：抑制効果なし、－：抑制効果ありを表す。

第5章 討論

乳清（ホエイ）を凍結乾燥およびスプレードライで粉末化すると、そのタンパク質含有量は 10～20% であるが、本研究では、生乳を殺菌後にウルトラフィльтраーション（UF）やマイクロフィльтраーション（MT）で膜分離処理を行うことで、脂質等の不純物を取り除きタンパク質含有量を 80% 以上としたホエイプロテイン濃縮物（WPC: Whey Protein Concentrate）を出発原料とした。

SDS-PAGE および GPC 分析の結果から、プロテアーゼ処理によって分子量が低下した WP は、5kDa 以下の分子量を有することが示された。さらに、WFA レクチンを使用した Western Blotting で確認されたビタミン D 結合タンパク質（GcMAF の前駆体）のバンド強度（約 56 kDa）は、プロテアーゼ処理後に大幅に減少したため、LMW-WP によるマクロファージ貪食活性の誘導は GalNAc によるものではないと推測した。LMW-WP は TNF- α 産生の誘導を示し、炎症を誘発したマクロファージによる TNF- α 産生の抑制効果を示さなかった。

ウシ乳房炎に対する臨床試験において、LMW-WP の投与経路として最初に経口投与を選択したが、有効性は 29%（7 分房中 2 分房で治療効果あり）と低い割合であった。経口投与で乳汁中の体細胞数が下がらなかった要因として、反芻動物であるウシの消化器が他の生物と比べて複雑である点が挙げられる。ウシには 4 つの胃があり、最も大きい胃は第 1 胃（ルーメン）と呼ばれ、成牛では 180 l の容量になる巨大な臓器である[33]。その第 1 胃には多くの微生物が共生しており、この微生物の作用で牧草等の飼料を発酵させることで栄養素として利用できる形に変換している。よって、LMW-WP の有効成分が第 1 胃に共生している微生物によって分解されたと推察した。次に、LMW-WP の有効成分の生物学的利用率を向上させる為に、腹腔内への投与を行った。その結

果、300mg では効果が得られなかったが、1000mg で治療効果が確認されたことから、乳房炎に対して有効な LMW-WP の投与量は 1000mg 以上であると示唆された。しかし腹腔内への投与は獣医師が行わなければならない、現場の農場での実施が困難であるという課題がある。そこで獣医師以外でも投与可能で高い生物学的利用率が期待できる方法として腔内投与を検討した。その結果、1000mg を 5 日間連続投与することで 75%（4 乳房中 3 乳房）の治療効果が認められた。この結果は、LMW-WP が腔の粘膜に吸収されていることを示唆している。

次に、ウシ乳房炎に対する LMW-WP の作用機序を解明するために、LMW-WP 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生能を評価した。LMW-WP は WP と比較して IL-5 は 1.53 倍、IL-6 は 1.77 倍、IL-9 は 1.49 倍、IL-12 は 1.45 倍、MCP-1 は 15.03 倍、VEGF は 2.06 倍の産生能の増加が確認された。選択的に好酸球の増殖・分化の促進、生存の延長、炎症関連分子の遊走を促進する IL-5 や免疫反応、造血、急性期反応に関与する IL-6 といった B 細胞の分化・増殖に関与するサイトカインやマクロファージを活性化させることで感染初期の菌の増殖を抑制する IL-12 の産生能の増強が確認された[34-36]。特に、単球走化因子である MCP-1 は約 15 倍の産生能を示した。MCP-1 はマクロファージ貪食活性能の増強作用に深く関わっている。さらに、活性化したマクロファージは TNF- α 産生の増加や CD-86 抗体の発現が確認されたことから、病原体や寄生虫感染防御に働く M1 型（炎症性マクロファージ）に分化したと推察した[37]。

乳汁中 IgA 濃度を測定した結果、治療の有効性が確認された乳房でのみ IgA 濃度の有意な低下が確認された。これは LMW-WP が小腸のパイエル板で IgA 産生細胞を活性化することで、乳房内の炎症箇所に IgA 産生細胞および IgA が集

積し細菌などの病原性微生物の侵入や毒素に結合し機能を無効化することで炎症を鎮め、その後 IgA 産生細胞のホーミングによって乳汁中 IgA 濃度が低下したと考察した。その為、有効性が確認されなかった乳房では、炎症が続いているため IgA 濃度の低下が確認されなかったと推察される。

ウシ乳房炎に対する LMW-WP の作用機序のもう一つの可能性として、LMW-WP に含まれる抗菌ペプチドの作用があると推測したが、抗菌性試験の結果より抗菌性ペプチドは関与していないことが示された。

第 6 章 結論

これらの結果より、LMW-WP はマクロファージ貪食活性および種々のサイトカイン産生を誘導することでウシ乳房炎の原因菌である黄色ブドウ球菌、レンサ球菌等に対する抑制効果を示したと考えられる。本研究から LMW-WP はウシ乳房炎に対して有効な治療剤となり得る可能性が示された。

第 7 章 謝辞

本論文の執筆に際し、お世話になった方々にこの場を借りてお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、徳島大学工学部生物工学科生物機能工学講座 宇都義浩教授、同講座 山田久嗣先生には、終始御懇篤なるご指導を承りました。また、最小発育防止濃度試験をご指導いただいた徳島大学 大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域 白井昭博先生、動物実験にご協力頂いた NOSAI 徳島 前橋克彦獣医師、充実した研究環境を整えてくださいました同講座 四方知子様には深く感謝致します。また講座の先輩方には、配属当初より実験の基

礎・基本を全て教えて頂きました。実験の相談に乗っていただき心より感謝致します。

第 8 章 参考文献

- [1] Cassetta L, Cassol E, Poli G: Macrophage polarization in health and disease. *Sci World J* 11: 2391-2402, 2011
- [2] Na YR, Je S, Seok SH: Metabolic features of macrophages in inflammatory diseases and cancer. *Cancer Lett* 413: 46-58, 2018.
- [3] McClean CM, Tobin DM: Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases. *Pathog Dis* 74: ftw068, 2016.
- [4] Kuchiike D, Uto Y, Mukai H, Ishiyama N, Abe C, Tanaka D, Kawai T, Kubo K, Mette M, Inui T, Endo Y, Hori H: Degalactosylated/desialylated human serum containing GcMAF induces macrophage phagocytic activity and in vivo antitumor activity. *Anticancer Res* 33: 2881-2885, 2013.
- [5] Y, Kawai T, Sasaki T, Hamada K, Yamada H, Kuchiike D, Kubo K, Inui T, Mette M, Tokunaga K, Hayakawa A, Go A, Oosaki T: Degalactosylated/desialylated bovine colostrum induces macrophage phagocytic activity independently of inflammatory cytokine production. *Anticancer Res* 35: 4487-4492, 2015.
- [6] Yamamoto N, Lindsay DD, Naraparaju VR, Ireland RA, Popoff SN: A defect in the inflammation-primed macrophage-activation cascade in osteopetrotic rats. *J*

- Immunol 152: 5100-5107, 1994.
- [7] Nagasawa H, Uto Y, Sasaki H, Okamura N, Murakami A, Kubo S, Kirk KL, Hori H: Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. *Anticancer Res* 25: 3689-3695, 2005.
 - [8] Koga Y, Naraparaju VR, Yamamoto N: Antitumor effect of vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor on Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 220: 20-26, 1999.
 - [9] Mohamad SB, Nagasawa H, Uto Y, Hori H: Preparation of Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) and its structural characterization and biological activities. *Anticancer Res* 22: 4297-4300, 2002.
 - [10] Kisker O, Onizuka S, Becker CM, Fannon M, Flynn E, D'Amato R, Zetter B, Folkman J, Ray R, Swamy N, Pirie-Shepherd S: Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. *Neoplasia* 5: 32-40, 2003.
 - [11] Inui T, Kuchiike D, Kubo K, Mette M, Uto Y, Hori H, Sakamoto N: Clinical experience of integrative cancer immunotherapy with GcMAF. *Anticancer Res* 33: 2917-2919, 2013.
 - [12] Inui T, Makita K, Miura H, Matsuda A, Kuchiike D, Kubo K, Mette M, Uto Y, Nishikata T, Hori H, Sakamoto N: Case report: a breast cancer patient treated with GcMAF, sonodynamic therapy and hormone therapy. *Anticancer Res* 34: 4589-4593, 2014.
 - [13] Inui T, Katsuura G, Kubo K, Kuchiike D, Chenery L, Uto Y, Nishikata T, Mette M: Case report: GcMAF treatment in a patient with multiple sclerosis. *Anticancer Res*

36: 3771-3774, 2016.

- [14] Inui T, Kubo K, Kuchiike D, Uto Y, Nishikata T, Sakamoto N, Mette M: Oral colostrum macrophage-activating factor for serious infection and chronic fatigue syndrome: three case reports. *Anticancer Res* 35: 4545-4549, 2015.
- [15] Marshall K: Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev* 9: 136-156, 2004.
- [16] Badr G, Ramadan NK, Sayed LH, Badr BM, Omar HM, Selamoglu Z: Why whey? Camel whey protein as a new dietary approach to the management of free radicals and for the treatment of different health disorders. *Iran J Basic Med Sci* 20: 338-349, 2017.
- [17] Alexander DD, Schmitt DF, Tran NL, Barraj LM, Cushing CA: Partially hydrolyzed 100% whey protein infant formula and atopic dermatitis risk reduction: a systematic review of the literature. *Nut Rev* 68: 232-245, 2010.
- [18] Kankanamge R, Jeewanthi C, Lee NK, Paik HD: Improved functional characteristics of whey protein hydrolysates in food industry. *Korean J Food Sci Anim Resour* 35: 350-359, 2015.
- [19] Tsenkova R, Atanassova S, Kawano S, Toyoda K: Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: A new diagnostic tool. *J Anim Sci* 79: 2550-2557, 2001. PMID: 11721833. DOI: 10.2527/2001.79102550x
- [20] Takahashi H: Early diagnosis and cytokine therapy of subclinical mastitis in dairy cows. *Proceedings of Japanese Society for Animal Nutrition and Metabolism* 49: 59-70, 2005. Available at:

- [21] Kiku Y: The questionnaire on diagnosis, treatment and prevention of bovine mastitis in Japan. *Journal of Japanese Society for Clinical Infectious Disease in Farm Animals* 5: 63-74, 2010. Available at:
- [22] Henriques M, Gomes F: Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic
10.1007/s00284-015-0958-8
- [23] Enginler SÖ, Sabuncu A, Kahraman BB, Koçak Ö, Yıldar E, Güzel Ö: Comparison of intramammary ozone administration doses in dairy cows with clinical mastitis. *Acta Sci Vet* 43: 1-7, 2015.
- [24] Ikuta K, Yamaguchi E, Hakogi E, Takagi M, Chida Y: Effects of the oral use of fermented stevia (*stevia rebaudiana*) extract on chronic or subclinical mastitis of dairy cows. *Bulletin of the Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries* 43: 10-15, 2007.
- [25] Ozawa T, Kiku Y, Mizuno M, Inumaru S, Kushibiki S, Shingu H, Matsubara T, Takahashi H, Hayashi T: Effect of intramammary infusion of rbGM-CSF on SCC and expression of polymorphonuclear neutrophil adhesion molecules in subclinical mastitis cows. *Vet Res Commun* 36: 21-27, 2012. PMID: 22057639. DOI: 10.1007/s11259-011-9506-6
- [26] Marshall K: Therapeutic applications of whey protein. *Alter Med Rev* 9: 136-156, 2004. PMID: 15253675.
- [27] Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE: A bovine whey protein extract stimulates human neutrophils to generate bioactive IL-1Ra through a NF-kappaB- and MAPK-dependent mechanism. *J Nutr* 140: 382-391, 2010. PMID: 20032479. DOI: 10.3945/jn.109.109645

- [28] Tasaka T, Kuwada E, Izuchi Y, Nishigawa R, Yamada H, Unuma H, Tokunaga K, Hayakawa A, Go A, Go K, Uto Y: Concentration-dependent activation of inflammatory/anti-inflammatory functions of macrophages by hydrolyzed whey protein. *Anticancer Res* 38: 4299-4304, 2018. PMID: 29970565. DOI: 10.21873/anticancer.12728
- [29] Yang MD, Hsu CM, Chang WS, Yueh TC, Lai YL, Chuang CL, Wang SC, Jeng LB, Ji HX, Hsiao CL, Wu CN, Tsai CW, Chung JG, Bau DT: Tumor necrosis factor- α genotypes are associated with hepatocellular carcinoma risk in taiwanese males, smokers and alcohol drinkers. *Anticancer Res* 35: 5417-5424, 2015. PMID: 26408704.
- [30] Sugawara G, Yokoyama Y, Ebata T, Igami T, Mizuno T, Nagino M: Prevention of perioperative infectious complications in patients undergoing hepatectomy for biliary cancer. *JJBA* 32: 849-859, 2018. DOI: 10.11210/tando.32.849
- [31] Li D, Sakashita S, Morishita Y, Kano J, Shiba A, Sato T, Noguchi M: Binding of lactoferrin to IGBP1 triggers apoptosis in a lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res* 31: 529-534, 2011. PMID: 21378334.
- [32] Arai I: Historical review of the quality control of raw milk in Japan. *Milk Sci* 55: 201-215, 2007. DOI: 10.11465/milk.55.201
- [33] Obara Y: “Applications of Stable Isotopes in Life Sciences”. Utilization of stable isotopes in nutritional physiology of domestic ruminant. *Radioisotopes* 56: 393-401, 2007. DOI: 10.3769/radioisotopes.56.393
- [34] Takatsu K: Allergic inflammation and eosinophils: Trials, tribulations and enigma of IL-5, eosinophils and asthma. *Arerugy* 54: 48-52, 2005. PMID: 15864017.

- [35] Hashizume M, Ohsugi Y: IL-6 as a target in autoimmune disease and inflammation. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 144: 172-177, 2014. PMID: 25312286. DOI: 10.1254/fpj.144.172
- [36] Kawamura I: Protective immunity against mycobacterium tuberculosis. *Kekkaku* 85: 539-546, 2010. PMID: 17154048.
- [37] Tomioka H, Tatano Y, Sano C, Shimizu T: M1 and M2 macrophage populations: those induced and activated by mycobacterial infections. *Kekkaku* 91: 75-82, 2016. PMID: 27263230.